Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Untersuchungen zum Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test nach Clausen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Barbara Fink-Lebsanft geb. Fink
aus Esslingen a. N.

1984

UNIV.
LEIDEN
LIBR.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536524_0017

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Untersuchungen zum Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test nach Clausen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Barbara Fink-Lebsanft geb. Fink
aus Esslingen a. N.

1984

Dekan: Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. A. Berg
2. Berichterstatter: Frau Privatdozent Dr. E. Heidemann

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Meiner Mutter

Die vorliegende Arbeit entstand von Mai 1978 bis November 1981 an der von Prof. Dr. H.D. Waller geleiteten Abteilung II der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. P.A. Berg.

Für die Überlassung des Themas und die ideelle und materielle Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. P.A. Berg hier herzlich danken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. N. Brattig, der mich mit vielen guten Ratschlägen unterstützte.

Ohne die bereitwilligen Blutspenden der Heizungsmechaniker der Klinik, der Mitarbeiter im Labor und auf Station wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ihnen allen sei an dieser Stelle besonders gedankt.

Abkürzungen

AVH	=	akute Virushepatitis
CAH	=	chronisch aggressive Hepatitis
FCS	=	fetal calf serum
HEPES	=	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
LIF	=	Leukozyten-Inhibitions-Faktor
LMIT	=	Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test
MI	=	Migrations-Index
MIF	=	Migrations-Inhibitions-Faktor
PMN	=	polymorpho-nuclear granulocytes
PPD	=	purified protein derivate (= Tuberkulin 'GT')
SIF	=	Serum-Inhibitions-Faktor(en)

Inhaltsangabe			Seite
EINLEITUNG			3
PATIENTEN, MATERIAL und METHODEN			9
	1.	Blutspender	9
	2.	Patientenseren	9
	3.	Material	10
	4.	Methoden	11
	4.1	TINE-Test	11
	4.2	Leukozyten-Migrations-Inhbitions-Test (LMIT) nach CLAUSEN	11
	4.3	PPD-induzierte Lymphozyten-Proliferation	16
	4.4	Tetanol-induzierte Lymphozyten-Proliferation	16
ERGEBNISSE			17
I	1.	Untersuchungen zur individuellen Schwankungsbreite der Leukozyten-Migration bei den getesteten Personen	17
	2.	Zuverlässigkeit der Auswertung der Migrationshöfe	17
II	A	UNTERSUCHUNGEN ZUR STANDARDISIERUNG DES TESTSYSTEMS	19
	1.	Einfluß der Zellzahl auf die Migrationshöfe	19
	2.	Abhängigkeit der Migrations-Inhibition von der PPD-Konzentration und der Anzahl der Granulozyten	20
	3.	Einfluß von autologem und heterologem Serum auf die Migration	21
	4.	Kinetik der Migrations-Inhibition	22
	4.1	Inkubation	22
	4.2	Präinkubation	24
	5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	29
	B	UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT DER MIGRATIONS-INHIBITION	30
	1.	Vergleich der Tuberkulin-Hauttest-Ergebnisse mit der Migrations-Inhibition	30
	2.	Testung der im LMIT verwendeten Leukozyten im Leukozyten-Transformations-Test	31

Seite

III EINFLUSS VON SEREN MIT IMMUNSUPPRESSIVEN FAKTOREN (SIF) AUF DIE PPD-INDUZIERTE MIGRATIONS-INHIBITION 33

Testung SIF-positiver Seren von Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis (CAH) und akuter Virushepatitis (AVH) im LMIT 33

DISKUSSION 36

ZUSAMMENFASSUNG 45

LITERATURVERZEICHNIS 47

EINLEITUNG

In Gegenwart von Antigenen produzieren spezifisch sensibilisierte Lymphozyten eine Reihe von löslichen Faktoren, sogenannte Lymphokine, die als Mediatoren der zellulären Immunantwort dienen.

Ausgedehnte Untersuchungen liegen vor allem über den Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) vor. Eine der Nachweismethoden dieses Faktors, der direkte Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test (LMIT) nach CLAUSEN ist Gegenstand dieser Arbeit.

RICH und LEWIS stellten 1928 zum ersten Mal eine Migrations-Inhibition von Phagozyten fest, indem sie Zellen aus der Milz eines Tuberkulin-sensibilisierten Kaninchens im flüssigen Medium in Gegenwart von Tuberkulin kultivierten.

Mit Hilfe einer neu entwickelten Kapillarmethode erbrachten GEORGE und VAUGHAN (1962) und später DAVID et al. (1964) an Peritoneal-Exsudat-Zellen vom Meerschweinchen ebenfalls den Nachweis einer zellvermittelten Antigen-spezifischen Immunantwort: 1966 wiesen BLOOM und BENNETT und DAVID et al. nach, daß dieselben Zellen, die in vivo eine verzögerte zelluläre Immunantwort zeigten, in vitro in Gegenwart desselben Antigens in ihrer Migration gehemmt wurden. Sie nannten den Mediator dieser Reaktion Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF).

MIF beim Meerschweinchen besteht nach heutigen Kenntnissen aus zwei Bestandteilen: dem pH 3-MIF mit einem Molekulargewicht von 65 000 dalton, der durch Neuraminidase zerstörbar, gegen Proteinase aber resistent ist, und dem pH 5-MIF mit einem Molekulargewicht von 25 000 dalton, der im Gegensatz zum pH 3-MIF durch Proteinase zerstörbar, gegen Neuraminidase aber resistent ist (REMOLD und MEDNIS 1977 bzw. 1979).

Auch der von menschlichen Lymphozyten gebildete MIF besteht aus zwei Komponenten:

ROCKLIN (1974, 1975, 1977) identifizierte den Leukozyten-Inhibitions-Faktor (LIF) mit dem Molekulargewicht von 68 000 dalton als Esterase mit Neuraminidase-Resistenz und der Fähigkeit, selektiv die Migration menschlicher polymorphkerniger Granulozyten zu hemmen, und den MIF mit einem Molekulargewicht von 25 000 dalton, ein saures Protein, das gegen Neuraminidase resistent ist und sowohl die Wanderung von Meerschweinchenmakrophagen als auch die menschlicher Monozyten inhibiert.

In der Literatur wird nicht streng unterschieden zwischen MIF und LIF. MIF steht in vielen Fällen für 'Migrations-Inhibitions-Faktor' und gibt keine Auskunft über die Natur der inhibierten Zellpopulation. SPITLER (1974) weist schon auf diese Begriffsverwirrung hin. Den in unserem System gemessenen Faktor werden wir im folgenden Leukozyten-Inhibitions-Faktor (LIF) nennen, da die Indikatorzellen hier menschliche polymorphkernige neutrophile Granulozyten sind.

In der Humanmedizin hat der Nachweis einer Produktion von LIF und MIF zur Feststellung einer Antigen-spezifischen Sensibilisierung von Patienten-Lymphozyten breite diagnostische Anwendung gefunden; so maßen z.B. WHITCOMB und ROCKLIN (1973) bei Patienten mit progressiver primärer Tuberkulose die Reagibilität der Lymphozyten auf das Antigen Tuberkulin (PPD) mit Hilfe von deren MIF-Bildungskapazität.

Patienten mit Zöliakie konnten DOUWES et al.(1977) durch den Nachweis einer LIF-Produktion der Lymphozyten auf den Kontakt mit dem Antigen Gliadin hin von Patienten mit anderen Krankheiten des Gastro-Intestinal-Traktes unterscheiden.

KATZ et al. (1971) verwendeten die MIF-Produktion durch Lymphozyten von Patienten mit Lepra als Unterscheidungskriterium zwischen lepromatöser und tuberkuloider Lepra. Als Antigen kam Lepromin zur Anwendung.

Der Nachweis von LIF und MIF ist methodisch immer noch problematisch. Zwei Methoden gewannen vor allem Bedeutung: die Agarosemethode und die Kapillarmethode. Letztere ist ein Verfahren, bei dem die Migration der Indikatorzellen aus Kapillarröhrchen auf eine Glasplatte im flüssigen Medium erfolgt. Diese Methode wurde von GEORGE und VAUGHAN (1962) zum ersten Male beschrieben und später von DAVID et al. (1964) übernommen. BLOOM und BENNETT (1966) verwendeten in Kapillaren statt Peritoneal-Exsudat-Zellen reine Makrophagen von Meerschweinchen als Indikatorzellen, SØBORG und BENDIXEN (1967) setzten periphere menschliche Lymphozyten ein. Diese Modifizierung der Kapillarmethode wurde weiter ausgearbeitet von ROSENBERG und DAVID (1970) und MAINI et al. (1973), die bezüglich der Kulturbedingungen, Antigen-Konzentration und Ausmessung der Migrations-Areale Änderungen einführten. GOLDBERG et al. (1971) verwendeten menschliche Monozyten.

Von mehreren Autoren wurde die Kapillarmethode jedoch kritisiert: KALTREIDER et al. (1969) und AX und TAUTZ (1974) stellten in Zweifel, daß die Wanderung der Indikatorzellen aus der Kapillare ein aktiver Vorgang ist. Bei Inkubation der Kapillaren im Winkel von 90° und 45° zur Horizontalen konnte keine aktive Migration aus der Kapillaröffnung mehr festgestellt werden.

Andere Autoren wiesen auf das sog. 'Escape-Phänomen' hin, das durch Aufhebung anfänglicher Migrations-Inhibition in späteren Inkubations-Phasen gekennzeichnet ist.

CLAUSEN (1973b) fand nach 4 Stunden Inkubation eine Migrations-Hemmung, die nach weiteren 16 Stunden wieder verschwand. BROSTOFF (1974) beobachtete nach 2-4 Stunden ebenfalls die größte Migrations-Inhibition, nach 17 Stunden hingegen nur geringe Inhibition. WARRINGTON et al. (1976) fand nach 6 Stunden optimale Migrations-Inhibition. Als Grund für dieses Escape-Phänomen wurde unter anderem die Tatsache aufgeführt, daß der pH im Kulturmilieu proportional zur steigenden Anzahl der Kapillaren pro Kulturschale steigt und da-

durch die Vitalität der Zellen abnimmt (WILLOUGHBY et al. 1978).

Bei der direkten Agarosemethode (CLAUSEN 1971) werden die mit Antigen vorinkubierten Zellen in Agar-Stanzlöcher gebracht und die Wanderung der Zellen zwischen Agar und Boden der Kulturschale beobachtet.

Mit der indirekten Agarosemethode (CLAUSEN 1972 und 1973 e) wird die migrations-inhibitorische Aktivität von Kulturüberständen gemessen, die durch mehrtägige Vorinkubation von spezifisch sensibilisierten Lymphozyten mit dem Antigen gewonnen wird.

Die Agarosemethode nach CLAUSEN hat gegenüber der Kapillarmethode wesentliche Vorteile:

Sie ist sensibler, ökonomischer in bezug auf Zellverbrauch und Antigenbedarf und im Falle der direkten Agarosemethode schneller durchführbar und technisch einfacher.

Im Hinblick auf die große klinische Relevanz dieses Testsystems und in Kenntnis der sich immer noch stellenden methodischen Probleme haben wir in vorliegender Arbeit versucht, den von CLAUSEN (1971) beschriebenen direkten Leukozyten-Migrations-Test (LMIT) zu modifizieren.

Wir stützten uns dabei auf ein definiertes System, indem wir Lymphozyten von Tuberkulin-positiven Spendern mit dem Antigen PPD testeten. Als Indikatorzellen dienten uns polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) derselben Spender.

Auf folgende Probleme wird besonders eingegangen:

1. Die technisch schwierige Ablese- und Ausmessungsmethode soll verbessert werden.

2. Es soll die optimale Anzahl der pro Ansatz verwendeten Leukozyten festgestellt werden. CLAUSEN (1973d) nennt eine optimale Zellzahl von 1.5 Mill. Leukozyten oder 0.5 Mill. Granulozyten pro Ansatz.

3. Weiterhin soll untersucht werden, mit welcher PPD-Konzentration im vorliegenden System die stärkste Migrations-Inhibition erreicht werden kann. Es liegen unterschiedliche Ergebnisse zu diesem Punkt in der Literatur vor. (CLAUSEN 1971, ASTOR et al. 1973, CLAUSEN 1973c, BERGSTRAND et al. 1974, MYGIND und STENBJERG 1974, LOHRMANN 1978).

   BULLEN und LOSOWSKI (1978) stellten fest, daß eine PPD-Konzentration von mehr als 200 µl/ml toxisch wirkt, CLAUSEN (1973c) hingegen findet bei 400 µgPPD/ml keine Toxizität.

4. Es soll der Einfluß von autologem und heterologem Serum im Agar getestet werden.

5. Untersuchungen über die optimale Prä-Inkubationszeit und Inkubationszeit schließen sich an, da auch hier die Angaben bei entsprechenden Autoren nicht einheitlich sind. Außerdem konnte mehrfach eine maximale Migrations-Inhibition zu einem frühen Zeitpunkt der Inkubation festgestellt werden (CLAUSEN 1971, 1973a, b, c, d; ERARD 1974; AX und TAUTZ 1974, WILLOUGHBY et al. 1978).

6. Zum Nachweis der Spezifität der Migrations-Inhibition in unserem Testsystem soll eine eindeutige Korrelation zwischen den Tuberkulin-Hauttest-Ergebnissen und der erreichten Migrations-Inhibition aufgezeigt werden. Die Antigen-Spezifität unseres Testsystems soll nachgewiesen werden, indem wir die Ergebnisse der spezifischen Lymphozyten-Transformation mit PPD mit der PPD-induzierten Migrations-Inhibition derselben Spender vergleichen.

In einem zweiten, kürzeren Abschnitt wurde der Einfluß von Seren von Patienten mit akuten und chronischen Lebererkrankungen auf unser definiertes Testsystem untersucht. Bei allen Seren war ein Gehalt an immunsuppressorischen Faktoren (SIF) festgestellt worden (BRATTIG und BERG 1976, BRATTIG 1978). Da früher gezeigt wurde, daß unter den selben Krankheitsbedingungen auch LIF gebildet werden kann (BRULEY-ROSSET et al. 1977, YOSHIDA et al. 1975), versuchten wir, sowohl die Immunsuppression als auch eine möglicherweise vorhandene LIF-Aktivität dieser Seren in unserem Testsystem nachzuweisen.

PATIENTEN, MATERIAL und METHODEN

1. Blutspender

Die zum Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test verwendeten Leukozyten stammten von Spendern aus dem Klinikpersonal der Medizinischen Universitätsklinik in Tübingen und Mitarbeitern des immunpathologischen Labors Prof.Dr. P.A. Berg.

Alle Blutspender waren im Versuchszeitraum gesund und nahmen keine Medikamente ein.

Anzahl der Personen:		16
Tuberkulin-positiv		13
	weibl.	4
	männl.	9
Tuberkulin-negativ		3
	weibl.	2
	männl.	1

2. Patientenseren

Die SIF-positiven Seren stammten von Patienten aus der Medizinischen Universitätsklinik in Tübingen, Abt. Prof. Dölle.

Anzahl der Patienten:		12
	weibl.	4
	männl.	8
Diagnosen: Chron. aggr. Hepatitis (CAH)		10
Akute virale Hepatitis (AVH) HB_SAG-pos		2

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum SIF-Gehalt der Seren wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Brattig überlassen.

3. Material

- TC 199-Kulturmedium (+ 20 mM HEPES, + Glutamin, ohne Bicarbonat) Flow Laboratories, Bonn, Kat. Nr. 1-049 M
- Dulbecco's Modification of Eagle's Medium 10-fach konz., Flow Kat. Nr. 1-002
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 10-fach konz., Flow Kat. Nr. 3-002 M
- HEPES-Puffer, Flow Kat. Nr. 3-065
- TC-Bicarbonate 10 %, Difco-Laboratories, Detroit, Michigan, USA, Kat. Nr. 5788-59
- Dextran 250, Serva Feinchemica, Heidelberg, Kat. Nr. 18 694
- Liquemin 250 000, Hoffmann- La Roche/Grenzach
- L-Glutamine 200 mM, Flow Kat. Nr. 6-134 B
- Agarose, Serva Kat. Nr. 11397
- Indubiose A 37, Industrie Biologique Française, Paris
- TC-Penicillin-Streptomycin, Difco Kat. Nr. 5854-59
- Purified Protein Derivate (PPD), Tuberkulin GT Behringwerke, Marburg
- Tuberkulin TINE-Test (Rosenthal), Lederle, Göppingen
- TC-Horse Serum Desiccated, Difco Kat. Nr. 5357-72
- May-Grünwald-Lösung, Merck, Darmstadt, Kat. Nr. 1424
- Giemsa-Lösung für Mikroskopie, Merck, Kat. Nr. 9204
- Formaldehyd 37 %
- Methanol
- Türk'sche Lösung, Merck, Kat. Nr. 9277
- Polyvinylpyrrolidon (PVP), Merck, Kat. Nr. 7443
- Centriflo^{R} Membranhülsen, Amicon, Witten, Kat. Nr. CF 50 A
- Milliporefilter Millex, 0,45 µm und 0,25 µm Ø, Millipore Corp., Frankfurt
- Falconröhrchen, 50 ml, Becton, Dickinson, Oxnard, USA, Kat. Nr. 2070
- Polypropylenröhrchen PPN, Greiner, Nürtingen, Kat. Nr. 2175
- Petrischalen für Gewebekultur, Greiner Kat. Nr. 60/15
- Hamiltonspritze, Fischer, Frankfurt, TLL Kat. Nr. 81420, 1002 N
- Orthoplan Auflicht-Mikroskop, Leitz/Wetzlar
- Zeicheneinrichtung, Leitz/Wetzlar
- Mettler Feinwaage H 20 T
- Tischrechner HP 97, Hewlett/Packard

- Forma Scientific Incubator (Modell 3156)
- Laminar-air-flow-Gerät, Ceag Schirp Reinraumtechnik

4. Methoden

4.1 Tuberkulin-Hauttest (TINE-TEST)

Die in-vivo-Testung der Immunitätslage gegenüber Tuberkulin erfolgte mit dem Tuberkulin-TINE-Test (Firma Lederle) in der vom Hersteller angegebenen Art und Weise. Hierbei werden intrakutan 5 IE Alttuberkulin injiziert. Als positiv gewertet wurde eine Papelbildung mit Rötung rund um eine oder mehrere Einstichstellen mit einem Durchmesser von mindestens 2 mm.

4.2 Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test (LMIT) nach CLAUSEN

Wir verwendeten die von CLAUSEN 1971 beschriebene Technik mit einigen Modifizierungen.

Herstellung der Leukozyten-Suspension

Venöses Blut wurde mit 50 IU/ml Heparin vermischt, in einem Differentialblutbild nach PAPPENHEIM wurde der prozentuale Anteil der PMN und mononukleären Zellen im Blut festgestellt. Nach Mischung des Blutes mit 5 %-iger Lösung Dextran 250 (in HBSS) im Verhältnis 4:1 erfolgte eine 1-stündige Sedimentation der Erythrozyten bei 37°C. Danach wurde der leukozytenreiche Überstand bis auf einen Rest von 0,5 cm abgehoben und dreimal in bicarbonatgepufferter HBSS (pH 7,4) gewaschen, abzentrifugiert (7 Min. bei 200 g) und mit Hilfe einer Pasteur-Pipette resuspendiert.

Die so gewonnenen Leukozyten wurden in HEPES-gepuffertem Eagle's Dulbecco's Medium (+ Glutamin 2 % + 100 IE Penicil-

lin + 100 µg Streptomycin/ml + 1,8 % Polyvinylpyrrolidon + 10 IE Heparin/ml, pH 7,4) auf eine Konzentration von $0,5x10^9$ PMN/ml eingestellt.

Im Differentialblutbild war der mittlere Anteil der PMN 65 %, der mononukleären Zellen 35 %.

Der Zellverlust durch Waschung und Resuspension wurde festgestellt durch Auszählung der Leukozyten des zellreichen Überstandes nach vorheriger Lyse der Erythrozyten mit Türk' scher Lösung vor und nach dem Waschungsvorgang. Der mittlere Zellverlust belief sich auf 40 % ($\pm$ 12 %).

Herstellung des Antigens PPD

Durch Auflösen von 20 mg lyophil getrocknetem Tuberkulin GT (PPD) wurde eine Stammlösung von 5 000 µg/ml in HEPES-gepuffertem Eagle's Dulbecco's Medium (s.o.) hergestellt. Diese Lösung wurde in Membranhülsen gefüllt und in 10 % HBSS (in aqua bidest. + 20 mM HEPES + 2N NaOH bis pH 7,4) unter mehrmaligem Austausch der Dialyseflüssigkeit über 24 Stunden dialysiert.

Anschließend wurden Lösungen mit einer Konzentration von 2 000, 1 000, 500, 450, 300, 200 und 100 µgPPD/ml durch Verdünnung gewonnen.

Herstellung des Agarose-Mediums

Durch Aufkochen von 1,2 g Agarose in 45 ml bidestilliertem Wasser, Abkühlen auf 48°C, Beimischen von 10 ml Pferdeserum (bzw. dekomplementiertem autologem Serum) und 45 ml doppelt konzentriertem HEPES-gepuffertem Eagle's Dulbecco's Medium, beides auf 48°C erhitzt, wurde eine 1,2 %-ige Agaroselösung hergestellt. Das fertige Medium enthielt so 10 % Pferde- oder autologes Serum, 2 mM Glutamin, 25 mM HEPES, 100 IE Penicil-

lin/ml, 100 µg Streptomycin/ml und 2N NaOH bis pH 7,4.

Nach guter Durchmischung der Lösungen wurden je 5 ml in Petrischalen von 6 cm Durchmesser gefüllt. Nach Erstarren des Agars wurden mit Hilfe einer Schablone 8 Löcher mit einem Durchmesser von 2,5 mm in die Agarose gestanzt.

Inkubation

25 µl der Zellsuspension wurden mit 25 µl der Antigen- bzw. Kontroll-Lösung gut vermischt und 2 Stunden (bzw. 1/2 Std., 1 Std.) bei 37°C in 5 % CO_2- und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre vorinkubiert. Die Zellen wurden während dieser Präinkubation in Abständen von 10 Minuten durch leichtes Schütteln der Behälter resuspendiert. Bei längerer Präinkubation (4, 6, 8 Std.) wurde die Zellkonzentration zur Verbesserung der Kulturbedingungen auf 1/50 der ursprünglichen Konzentration eingestellt. Die Suspensionsflüssigkeit setzte sich bei gleicher PPD-Konzentration aus 20 % autologem Serum, 30 % PPD- bzw. Kontroll-Lösung und 50 % Eagle's Dulbecco's Medium mit suspendierten Zellen (Konzentration 0.005×10^9/ml) zusammen. Nach der Präinkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (7 Min. bei 200 g) und in 1/50 der Suspensionsflüssigkeit resuspendiert, so daß die ursprünglich geforderte Zellkonzentration von $0{,}25 \times 10^9$ PMN/ml wieder hergestellt war. Sollte der Einfluß von SIF^+-Seren getestet werden, wurden der verdünnten Zellsuspension während der Präinkubationszeit statt 20 % autologem Serum 20 % SIF-positives Serum zugesetzt.

Dann wurden von der Antigen-haltigen und der Kontroll-Lösung je 4 Zellportionen zu 10 µl in je 4 Agarlöcher eingefüllt, so daß sich Test- und Kontrollansatz in derselben Schale befanden.

Die Inkubationsdauer war 18 Std. (bzw. 3, 6, 12, 24 Std.). Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einem 'laminar-air-flow'-Gerät durchgeführt.

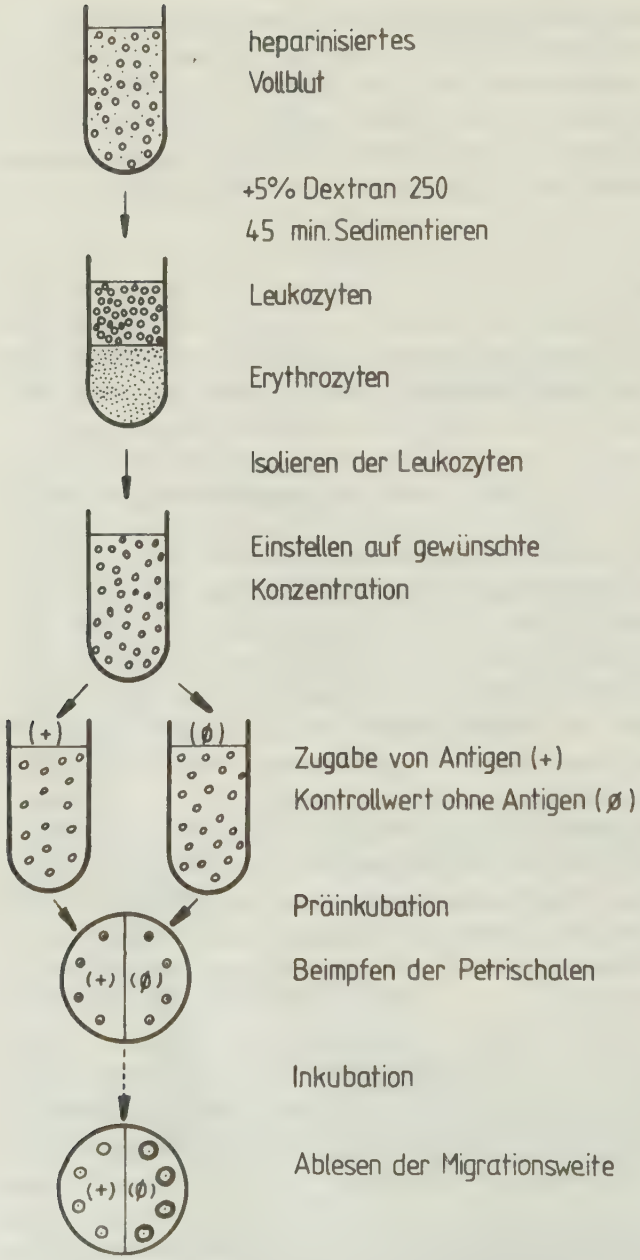

Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung des Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Tests (LMIT) nach CLAUSEN

Auswertung der Testergebnisse

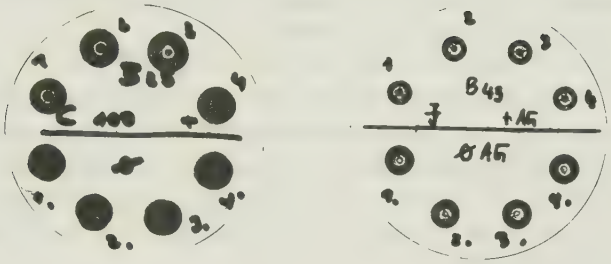

Abb. 2 a) b)
Direkter LMIT mit Leukozyten Tuberkulin-negativer (a) und Tuberkulin-positiver (b) Spender. Im oberen Anteil der Petrischale wanderten die Leukozyten mit Zusatz von spezifischem Antigen, im unteren befinden sich die Kontrollansätze ohne spezif. Antigen. Die Migrationshöfe wurden unter folg. Bedingungen gewonnen: 0.25×10^6 Leukozyten/µl (2.5×10^6 Zellen pro Ansatz), 150 µl/ml PPD, 6 h Präinkubation und 6 h Inkubation.

Die Ansätze wurden nach der Inkubation mit Methanol übergossen. Danach folgte eine 20-minütige Fixation mit Formalin, dann wurden die am Boden der Petrischalen haftenden Agaroseplatten abgelöst. Die auf dem Boden fixierten Zellen wurden nach PAPPENHEIM gefärbt und getrocknet.

Mit Hilfe einer Mikroskop-Zeicheneinrichtung wurden die Migrationshöfe vergrößert auf Papier übertragen, ausgeschnitten und gewogen.

Anschließend wurde ein Quotient aus der Hofgröße ohne Antigen und derjenigen mit Antigen gebildet. Der so berechnete Migrations-Index (MI) gab Aufschluß über eine eventuelle spezifische Migrations-Inhibition.

4.3 PPD-induzierte Lymphozyten-Proliferation

Die Lymphozyten von Tuberkulin-positiven und Tuberkulin-negativen Spendern wurden in Polypropylenröhrchen mit PPD-Konzentrationen von 0, 6.5, 12.5, 25, 75, 100 und 150 µgPPD/ml während fünf Tagen inkubiert.

Die Stammlösung von PPD-Tuberkulin wurde vor Verwendung 24 Stunden lang gegen HEPES gepufferten Hanks-Puffer dialysiert und anschließend sterilfiltriert. Gemessen wurde die Proliferation der Lymphozyten anhand der ^{3}H-Thymidin-Einbaurate. Jeder Wert wurde als Mittelwert aus drei Parallelansätzen berechnet.

4.4 Tetanol-induzierte Lymphozyten-Proliferation

Ebenso wurde bei der zur Kontrolle durchgeführten Tetanol-Stimulation der selben Lymphozyten verfahren. Hier wurden Verdünnungen von 0, 1:100, 1:250, 1:625, 1:1562, 1:3906, 1:9765, 1:24414 verwendet.

ERGEBNISSE

I 1. Untersuchungen zur individuellen Schwankungsbreite der Leukozyten-Migration bei den getesteten Personen

Hierzu wurde die Größenschwankung der Migrationshöfe ohne Antigen-Zusatz von 7 Personen durch mehrfache Testung innerhalb eines halben Jahres gemessen.

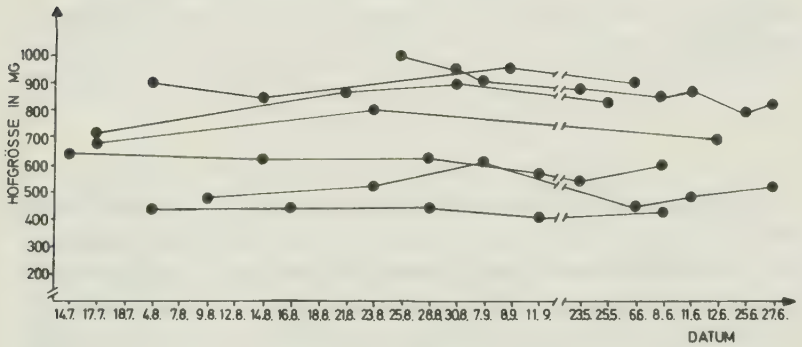

Abb. 3: Intraindividuelle Schwankung der Migrationshofgröße innerhalb eines halben Jahres bei einem Verhältnis Präinkubation (PI) / Inkubation (I) von 6h / 6h, 2.5×10^6 Granulozyten / Ansatz. Mehrfachmessungen an 7 Spendern.

Beim Vergleich scheint sich die Migrationsweite auf ein für die Person spezifisches individuelles Niveau einzustellen, von dem die Einzelwerte nur geringfügig abweichen.

2. Zuverlässigkeit der Auswertung der Migrationshöfe

Wie im Methodenteil ausführlich beschrieben, wurden die Migrationshöfe fixiert und angefärbt (s. Abb. 2). Die Protokollierung der Größe der Migrationshöfe erfolgte am Mikro-

skop nach dem Mischbildverfahren. Hierzu wurden die Migrationshöfe in 25-facher Vergrößerung mit Hilfe einer Zeicheneinrichtung (Firma Leitz/ Wetzlar, Zusatzgerät zum ORTHOPLAN-Mikroskop) unter Sichtkontrolle abgezeichnet. Gleichbleibende Entfernung der Zeichenebene vom Einblende-Okular war durch Konstruktion eines fixen Zeichentisches gewährleistet.

Als Zeichenpapier dienten bei allen Versuchen Karteikarten derselben Charge. Die vergrößerten Migrationshöfe wurden ausgeschnitten und auf einer Präzisionswaage gewogen. Ein Migrations-Index wurde nach Clausen (1971) nach folgender Formel bestimmt:

$$MI = \frac{M_A}{M_K}$$

Dabei entspricht M_A dem mittleren Gewicht der 4 Migrationshöfe mit Zusatz von Antigen und M_K dem mittleren Gewicht der 4 Migrationshöfe ohne Zusatz von Antigen. Eine eindeutige Migrations-Inhibition und damit das Vorliegen einer zellvermittelten Immunreaktion wurde bei einem Migrations-Index (MI) unter 0,8 angenommen.

Zur Beurteilung des vorliegenden Auswertungsmodus ermittelten wir folgende Daten:

Die Standardabweichung des mittleren Gewichtes von 10 beliebigen Karteikarten einer Charge lag bei 0.4 - 0.6 %. Die Standardabweichung bei je 10-facher Messung von 5 verschiedenen Höfen ergab 1.2 - 3.2 %.

Außerdem errechneten wir eine Standardabweichung der Vierfachansätze untereinander bei allen Versuchen von 0.5 - 10 %. Die mittlere Standardabweichung bei allen Versuchen war 6.5 %.

II A UNTERSUCHUNGEN ZUR STANDARDISIERUNG DES TESTSYSTEMS

1. Einfluß der Zellzahl auf die Migrationshöfe

An 10 Spendern wurde unter denselben Versuchsbedingungen der Einfluß der Zellzahl auf die Größe der Migrationshöfe getestet.

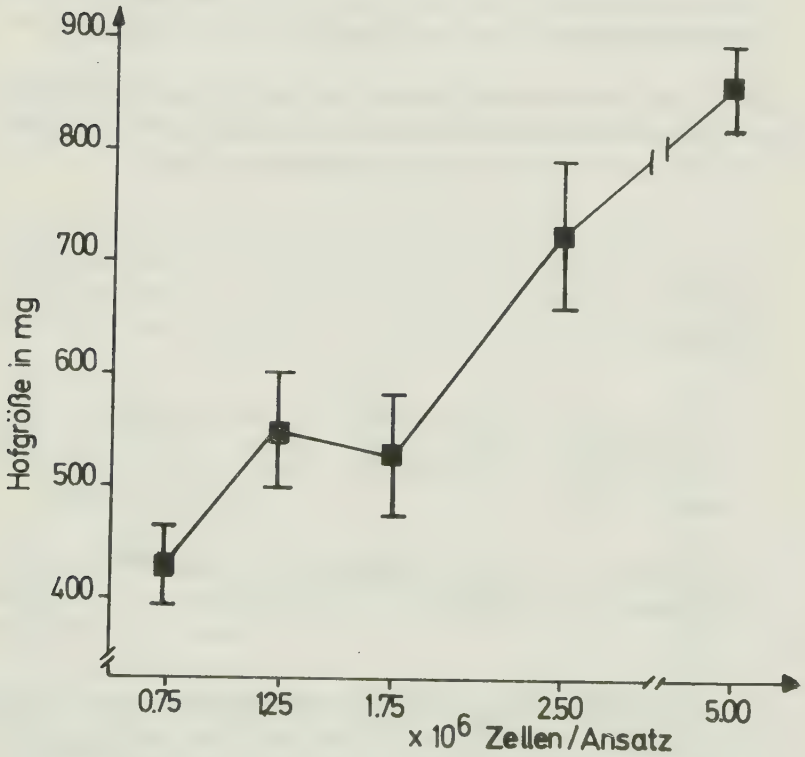

Abb. 4: Mittlere Migrationshofgröße in Abhängigkeit von der Zellzahl pro Ansatz, getestet an 10 Spendern. Versuchsbedingungen: Präinkubation/Inkubation 2h/18h.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine Zellzahl von 2.5×10^6 pro Ansatz für nahezu optimale Migration ausreicht. Eine Verdoppelung der Zellzahl bringt nur noch einen vergleichsweise geringen Migrationszuwachs.

Die Zellzahl von 2.5×10^6 pro Ansatz wurde für die folgenden Versuche übernommen.

2. Abhängigkeit der Migrations-Inhibition von der PPD-Konzentration und der Anzahl der Granulozyten

Der Einfluß der Granulozytenzahl und die Wirkung von verschiedenen PPD-Konzentrationen auf die in unserem System gemessene Migrations-Inhibition sollte gemessen werden.

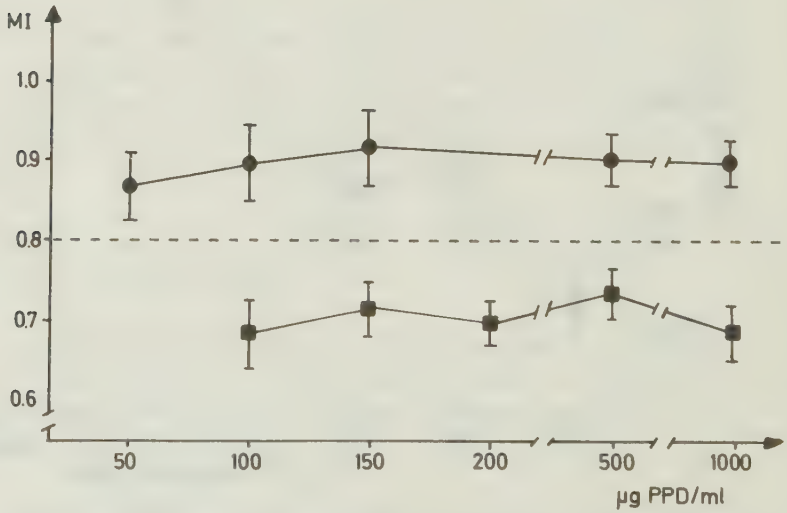

Abb. 5: Mittelwerte der erreichten Migrations-Indices bei zwei verschiedenen Granulozytenzahlen und steigenden PPD-Konzentrationen. Präinkubation/Inkubation 2h/18h. ●—● Bei einer Granulozytenzahl von 1.25×10^6 wurde der Einfluß von 50, 100, 150, 500 und 1000 µg/ml PPD auf die Migrations-Inhibition

gemessen. Es sind Mittelwerte der Migrations-Indices von 4 getesteten Tub.-pos. Personen angegeben.

Mittelwerte der Migrations-Indices bei der als optimal ermittelten Zellzahl von 2.5×10^6 Granulozyten. Es wurde die Migrations-Inhibition bei 100, 150, 200, 500 und 1000 µg PPD/ml bei 6 Tub.-pos. Personen getestet.

Bei der niederen Zellkonzentration lagen die Migrations-Indices im Mittel bei allen PPD-Konzentrationen über 0.8, d.h. eine Migrations-Inhibition war bei dieser Zellzahl nicht nachweisbar.

Nach Verdoppelung der Zellkonzentration konnten wir bei allen Tub.-pos. Personen mit allen PPD-Konzentrationsstufen eindeutige Migrations-Inhibition nachweisen.

Als Kontrolle dienten uns die Granulozyten von 3 Tub.-neg. Spendern, die bei einer Zellzahl von 2.5×10^6 bei keiner PPD-Konzentration Migrations-Inhibition zeigten. Somit war ein toxischer Einfluß der PPD-Konzentrationen ausgeschlossen.

3. Einfluß von autologem und heterologem Serum auf die Migration

Wir untersuchten den Einfluß des Zusatzes von Pferdeserum zum Agar und verglichen die Migration mit den Ergebnissen im autologen Serum.

Im heterologen Serum war die Migration ohne Antigen bei den 6 Personen im Mittel um 20 % vermindert. Die Migration mit Antigen war sowohl bei 150 µg PPD/ml als auch bei 1000 µg PPD/ml im Mittel um 22 % vermindert (Ergebnisse sind nicht dargestellt).

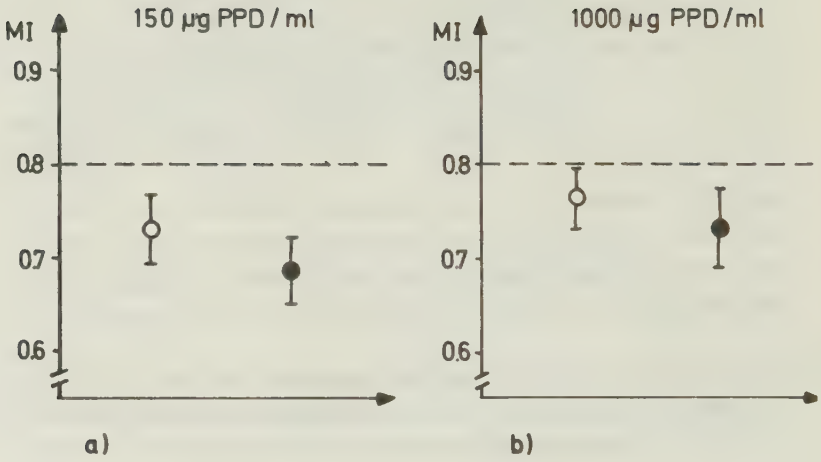

Abb. 6: Einfluß von autologem (o) und heterologem Serum (●) auf den mittleren Migrations-Index bei PPD-Konzentrationen von 150 (a) und 1000 (b) µg PPD/ml, getestet an je 6 Tub.-pos. Personen. Präinkubation/ Inkubation 2h/6h. Zellzahl 2.5 x 10^6 Granulozyten/ Ansatz.

Wie Abb. 6 zeigt, war durch Zugabe von heterologem Serum keine wesentliche Änderung der Migrations-Indices nachzuweisen.

4. Kinetik der Migrations-Inhibition

4.1 Inkubation

In einem Vorversuch stellten wir den Zeitpunkt der maximalen Migrationsweite ohne Antigen-Zusatz fest. Hierzu untersuchten wir unter gleichbleibenden Kulturbedingungen den Einfluß der Inkubationsdauer auf die Größe der Migrationshöfe. Die Migration wurde bei 6 Personen nach 3, 6, 12, 18 und 24 Stunden unterbrochen.

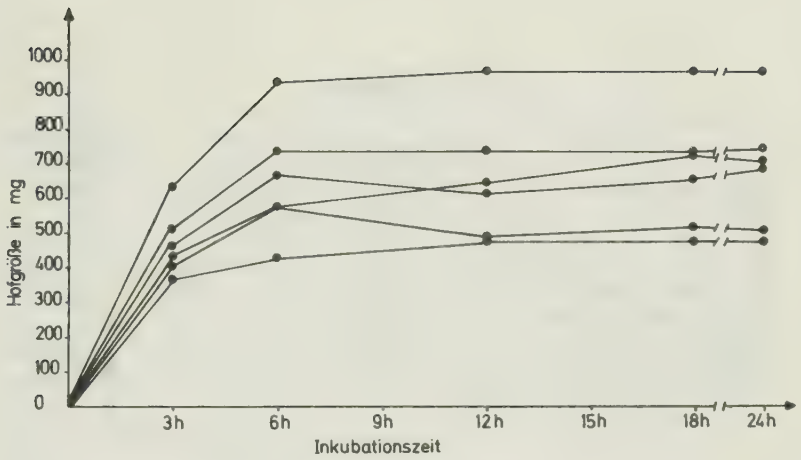

Abb. 7: Größe der Migrationshöfe in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Zellzahl 2.5 x 10^6 Granulozyten pro Ansatz.

Innerhalb der ersten 6 Stunden konnte bei allen Personen das Maximum der Migration erreicht werden.

Weiterhin wurde unter gleichen Versuchsbedingungen der Einfluß der Inkubationsdauer auf die Migrations-Inhibition untersucht.

Inkubationszeit	Versuchsperson 1	2	3	4	5	tub.-neg. Kontr.
3h	-	-	0.79	0.65	0.77	0.96
6h	0.63	0.72	0.70	0.63	0.66	1.00
12h	0.66	0.79	0.70	0.67	0.77	0.90
18h	0.68	0.72	0.60	0.67	0.75	0.89
24h	0.70	0.72	-	-	-	-

Tab. 1: Abhängigkeit der Migrations-Indices von der Inkubationszeit. Messung an 5 Tub.-pos. und 1 Tub.-neg. Person, Zellzahl 2.5 x 10^6, 150 µg PPD/ml. Präinkubation 2 h.
Bei 2 von 5 Personen lagen Werte zusätzlich nach 24 h, bei 3 von 5 nach 3h vor.

Eine deutliche Inhibition war nach 6h Inkubation bei allen Personen nachweisbar.

4.2 Präinkubation

Ausgehend von der Beobachtung in Vorversuchen, daß eine Präinkubation von 1/2 h bei 7 Tuberkulin-positiven Personen mit 50, 100 und 150 µl PPD/ml selbst nach 18h Inkubation nicht zu einer meßbaren Migrations-Inhibition führte, variierten wir im folgenden die Präinkubation, also die Zeit des unmittelbaren Kontaktes der Leukozyten mit dem Antigen zwischen 1/2, 1, 2, 4, 6 und 8 h und untersuchten die Auswirkungen auf die Zellmigration mit und ohne Antigen.

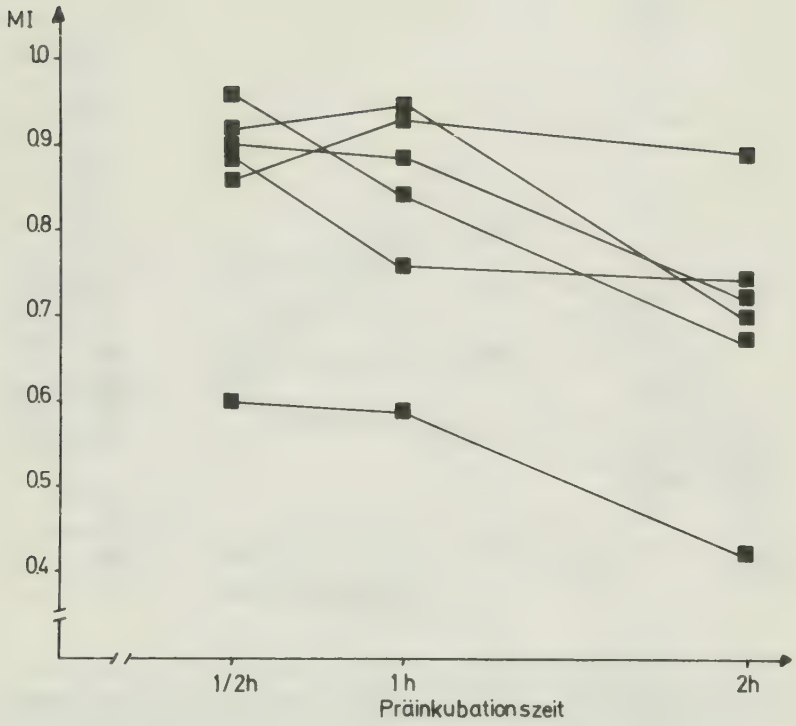

Abb. 8: Einfluß der Präinkubationszeit von 1/2h, 1h, 2h bei 6h Inkubation auf den Migrations-Index. Messung an 6 Spendern bei einer Zellzahl von 2.5 x 10^6 Granulozyten.

Erst bei einer Präinkubation von 2h ließ sich bei 5 von 6 Personen eine Migrations-Inhibition nachweisen.

Wir verlängerten bei 5 Personen die Präinkubationszeit auf 4h, 6h und 8h.

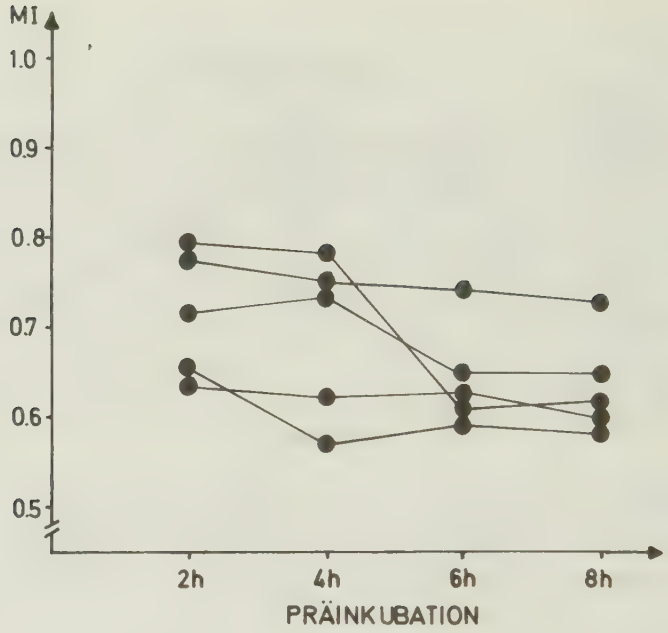

Abb. 9: Abhängigkeit des Migrations-Index von 5 Personen von der Präinkubationszeit 2h, 4h, 6h, 8h bei einer Inkubation von 6h. Zellzahl 2.5 x 10^6 Granulozyten. Diese verlängerte Präinkubation erforderte eine Verbesserung der Kulturbedingungen (s. Methoden).

Es zeigte sich, daß ab der 6. Präinkubationsstunde bei allen Personen eine verstärkte Migrations-Inhibition nachzuweisen war.

Zwischen der 6. und 8. Präinkubationsstunde änderte sich die Migrations-Inhibition nicht mehr wesentlich.

Da die Möglichkeit einer Alteration der Leukozyten bei Verlängerung der Präinkubation bestand, wurde als Kontrolle die Hofgröße ohne Antigen gemessen.

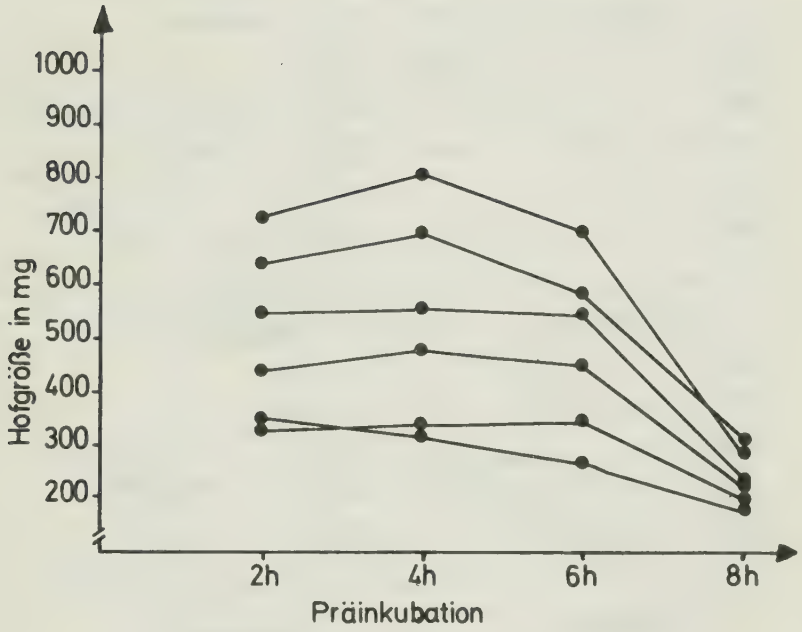

Abb. 10: Abhängigkeit der absoluten Hofgröße ohne Antigen von der Präinkubation 2, 4, 6, 8h. Zellzahl 2.5×10^6 Granulozyten. Messung an 6 Personen.

Wie Abb. 10 zeigt, kam es zu einer deutlichen Abnahme der Migration bei einer Präinkubation von 8 h.

Um eine optimale Relation von Präinkubation und Inkubation zu finden, verglichen wir die Migrations-Indices von 5 Tub.-pos. und 1 Tub.-neg. Spender bei verschiedenen Kombinationen von Präinkubation und Inkubation (s. Abb. 11, S. 28).

Es zeigte sich, daß v.a. bei schwach positiven Reaktionen mit einer Kombination von 6h Präinkubation und 6h Inkubation die zuverlässigsten Ergebnisse erzielt werden konnten.

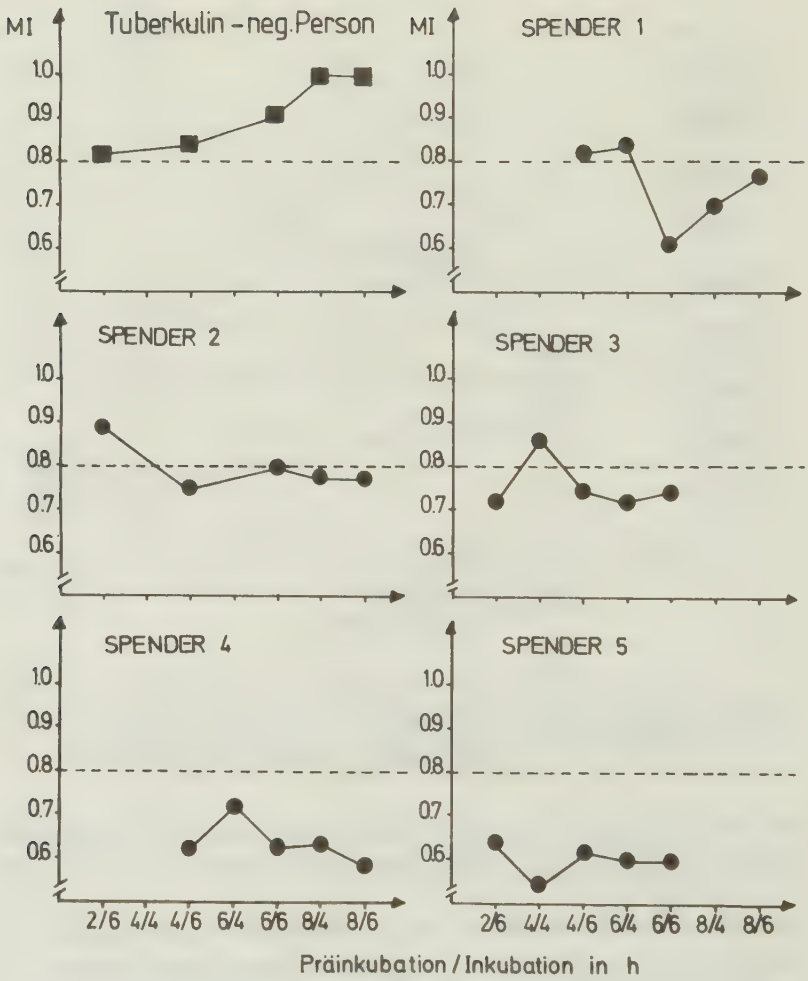

Abb. 11: Migrations-Index in Abhängigkeit vom Verhältnis Präinkubation zu Inkubation. (●——●) = Tub.-pos. Spender 1-5, (■——■) = Tub.-neg. Kontrollperson. Zellzahl 2.5 x 10^6 Granulozyten. PPD-Konzentration 150 µg/ml.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

An 4 der Tub.-pos. Spender wurden abschließend exemplarisch noch einmal die schrittweisen Veränderungen der Versuchsbedingungen nachvollzogen.

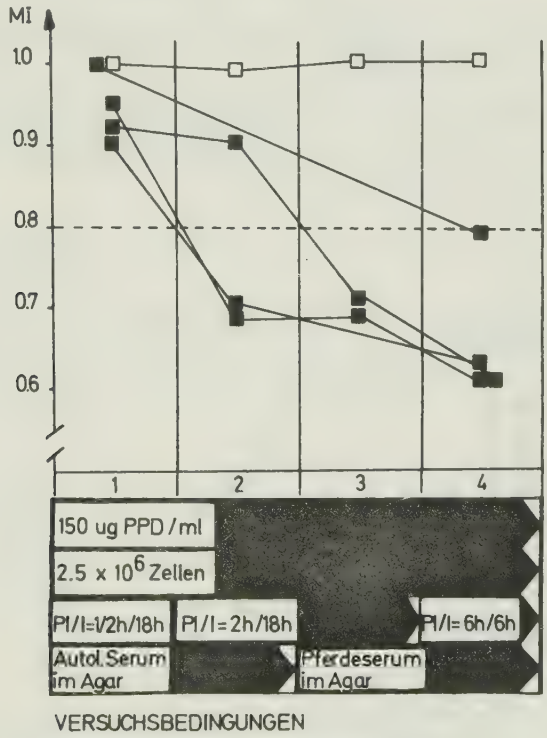

Abb. 12: Migrations-Indices von 4 Tub.-pos. (■——■) und 1 Tub.-neg. (□——□) Spender unter verschiedenen Versuchsbedingungen (in Spalten unter 1-4 angegeben.)

Unter den in (1) aufgeführten Anfangsbedingungen konnte bei keiner der getesteten Personen eine Migrations-Inhibition nachgewiesen werden. Erst unter den von uns als optimal ge-

fundenen Bedingungen (4) wird die Inhibition bei allen Tub.-pos. Personen nachweisbar.

B UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT DER MIGRATIONS-INHIBITION

1. Vergleich der Tuberkulin-Hauttest-Ergebnisse mit der Migrations-Inhibition

Wir errechneten von den 13 Tub.-pos. Personen nach Einteilung entsprechend dem Grad der Hautreaktion im TINE-Test zwei mittlere Migrations-Indices.

Hautreaktion

Papelbildung mit Ø 10-20 mm, konfluiert ..... n = 7
Papelbildung mit Ø 2-3 mm, nicht konfluiert .. n = 6

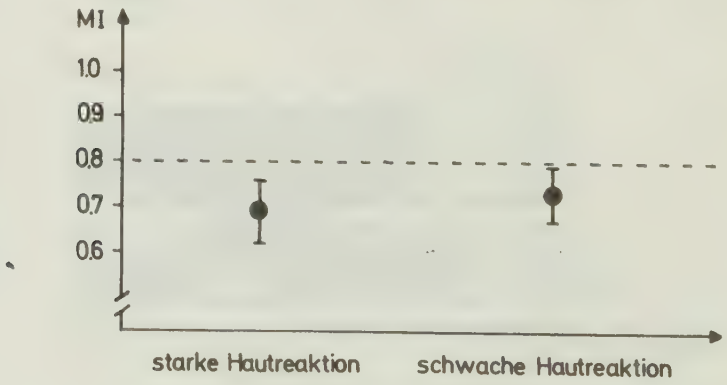

Abb. 13: Mittlerer Migrations-Index der in zwei Sparten nach der Hautreaktion eingeteilten Tub.-pos. Spender.

Alle im Hauttest positiven Spender wiesen eine eindeutige Migrations-Inhibition mit Indices unter 0.8 auf. Es konnte jedoch keine eindeutige Beziehung zwischen der Intensität

der Hautreaktion und dem Grad der Migrations-Inhibition im PPD-System festgestellt werden.

2. Testung der im LMIT verwendeten Leukozyten im Leukozyten-Transformations-Test

Um die Spezifität der in unserem System gemessenen Lymphozytenreaktionen nachzuweisen, verglichen wir die Ergebnisse des Lymphozyten-Transformationstestes mit PPD und dem nicht-spezifischen Antigen Tetanol.

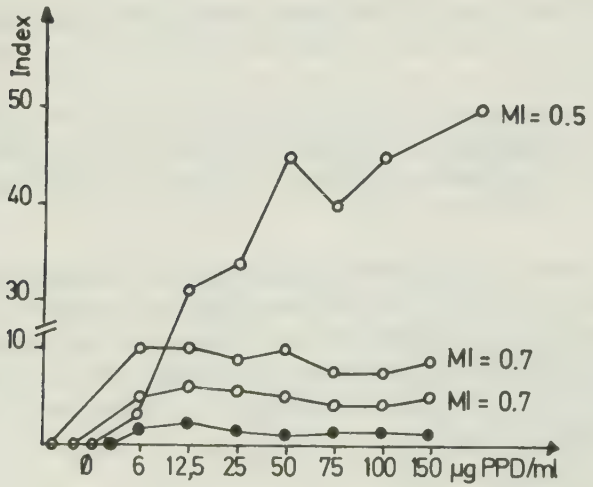

Abb. 14: Lymphozyten-Transformations-Test mit PPD und Lymphozyten von 3 Tub.-pos. (o——o) und 1 Tub.-neg. (●——●) Spender. Migrations-Inhibitions-Indices s. Schaubild.

Ab der Konzentration von 6 µg PPD/ml konnte bei den Tub.-pos. Personen eine eindeutige Steigerung der ^{3}H-Thymidin-Einbaurate festgestellt werden, während die Lymphozyten der Tub.-neg. Person nur wenig proliferierten.

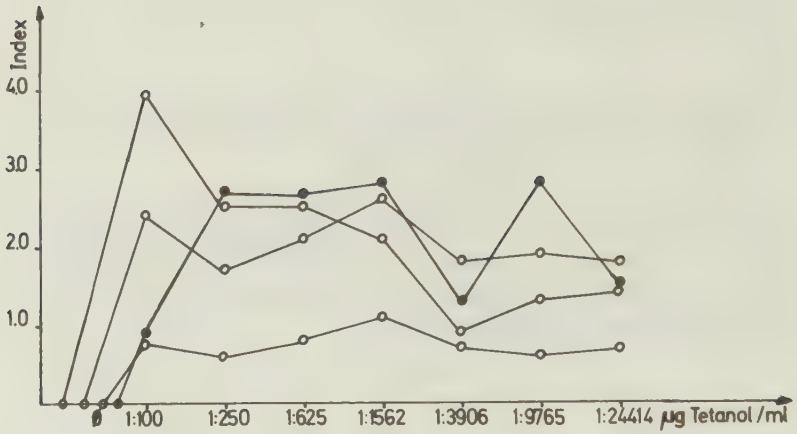

Abb. 15: Lymphozyten-Transformations-Test mit Tetanol und Lymphozyten von 3 Tub.-pos. (O——O) und 1 Tub.-neg. (●——●) Personen. Tetanol in zunehmender Verdünnung.

Unter Tetanol-Stimulation reagierten die Lymphozyten der Tub.-pos. und -neg. Spender mit gleicher, nur geringer Proliferation. Dies diente uns als Beweis für die normale Funktionsfähigkeit der Lymphozyten. Eine etwaige Funktionsschwäche der Tub.-neg. Lymphozyten im Versuch mit PPD ist somit ausgeschlossen.

III EINFLUSS VON SEREN MIT IMMUNSUPPRESSIVEN FAKTOREN (SIF) AUF DIE PPD-INDUZIERTE MIGRATIONS-INHIBITION

Testung SIF-positiver Seren von Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis (CAH) und akuter Virushepatitis (AVH) im LMIT

Um festzustellen, inwieweit SIF-positive Seren auch LIF enthalten und damit die PPD-induzierte Migrations-Inhibition zusätzlich beeinflussen können, testeten wir Seren mit unterschiedlicher SIF-Aktivität in unserem Testsystem.

Die Resultate im LMIT werden als Änderung der Migration angegeben. Die SIF-Test-Ergebnisse erscheinen in Form eines Quotienten aus der ^{3}H-Thymidin-Einbaurate von PAH-stimulierten Lymphozyten im Patientenserum und der Einbaurate derselben Lymphozyten in Gegenwart von Normalserum. Der so erreichte 'Inhibitions-Index' wurde nach BRATTIG (1978) in 4 Grade eingeteilt.

Aktivitätsgrad	Inhibitions-Index	Wirkung
0	0.7	keine Hemmung
I	0.5-0.65	schwache Hemmung
II	0.3-0.45	eindeutige Hemmung
III	0.1-0.25	starke Hemmung
IV	0.1	sehr starke Hemmung

Die hier getesteten Seren waren alle in die Gruppen I-III einzuordnen.

Serum Nr.	Diagnose	SIF-Grad	SIF-Index	%Hemmung d.Migration i.Leerwert	%Hemmung d.Migration i.PPD-Wert
1	AVH	III	0.17	55/59	12.5/37
2	CAH		0.10	45/45	23/12.5
3	CAH		0.22	33/47	8/9
4	CAH		0.15	54/16	43/0
1	AVH	II	0.35	-20/0	-16/-3
2	CAH		0.45	-12/18	-13/-44
3	CAH		0.40	- 8/-19	-12/-23
4	CAH		0.30	18	- 12
1	CAH	I	0.60	10/20	Ø
2	CAH		0.60	21 / Ø	-10/-9

Tab. 2: Vergleich der Ergebnisse des SIF-Testes mit der Änderung der Migration durch SIF-pos. Seren im PPD-System.

Die Zugabe von SIF-pos. Seren zu unserem System wirkte sich, wie in Tab. 2 dargestellt ist, folgendermaßen auf die Migration aus:

a) starke Migrations-Inhibition der Leerwerte, weniger starke Inhibition der PPD-Werte bei allen SIF-positiven Seren des Aktivitätsgrades III.

b) die SIF-positiven Seren der Gruppe II hatten keinen gleichsinnigen Einfluß auf die Leerwerte, bei allen PPD-Werten wurde die Migrations-Inhibition aufgehoben ("negative" Hemmung der Migration).

c) bei den 2 SIF-positiven Seren des Aktivitätsgrades I wurde die Migration im Leerwert gehemmt, Serum 1 hatte keinen Einfluß auf den PPD-Wert, während Serum 2 hier die Migration aufhob.

DISKUSSION

Die Arbeit hatte zum Ziel, die von CLAUSEN 1971 beschriebene Agarosemethode zum Nachweis von LIF zu verbessern, damit diese für die Klinik so wichtige Nachweismethode einer zellulären Immunität zuverlässig eingesetzt werden kann.

Aus den vorgelegten kinetischen Untersuchungen geht eindeutig hervor, daß die Standardisierung eine wesentliche Voraussetzung zum sensiblen Nachweis von LIF ist.

Wichtigstes Ergebnis war, daß eine Präinkubation der Leukozyten mit Antigen von sechs Stunden notwendig ist, um LIF deutlich nachzuweisen.

Ferner sollte die Messung der Migrationshöfe in Form einer einfachen und in der Klinik leicht reproduzierbaren Methode standardisiert werden, eine Untersuchung, die bisher in einschlägigen Publikationen zu wenig berücksichtigt wurde. Am Ende der Arbeit wurde versucht, festzustellen, inwieweit LIF noch mit anderen immunregulativen Faktoren, wie z.B. SIF (Serum-Inhibitions-Faktor) assoziiert ist.

Obwohl die CLAUSEN-Technik an sich einfach erscheint, sind doch einige technische Details bei der Durchführung dieses Testes prinzipiell zu berücksichtigen.

Sedimentation

Wir verwendeten nach CLAUSEN bei allen Versuchen 5 % Dextran zur Sedimentation der Erythrozyten. Die Erythrozyten-Kontamination ist nach BENDIXEN und SØBORG (1970) im leukozytenreichen Überstand nach Dextransedimentation größer als nach Spontansedimentation. Dieser Erythrozytenanteil wirkt sich jedoch nach BENDIXEN und SØBORG (1970), CLAUSEN (1971) und TS'AO und RUDER (1976) auf den direkten Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test im Gegensatz zur Wirkung auf

die Kapillarmethode (SPITLER et al. 1969, ROSENBERG und DAVID 1970) nicht negativ aus, was wir durch Vorversuche bestätigen konnten.

Waschvorgänge

Durch wiederholte Zählungen errechneten wir einen mittleren Leukozytenverlust von 40 % ($\pm$ 12 %) durch Waschvorgänge und Resuspension. Dieser relativ hohe Prozentsatz ist auf die zur vollständigen Resuspension des Zellpellet notwendige, häufig wiederholte Aufwirbelung der Zellen mit Hilfe einer Pasteur-Pipette zurückzuführen.

TS'AO und RUDER (1976) fanden schon nach einer Aufwirbelung von 10 sec. Dauer eine Alteration der Leukozyten, wobei es bei Monozyten zu Pseudodopodienbildung und bei Granulozyten zu Vakuolisierung kam. Die bei unserer Methode der Resuspension erreichte Zeit von 60 sec. wäre nach TS'AO und RUDER für die meisten Leukozyten destruktiv.

Dennoch hatten wir nach 40 % Zellverlust durch Waschung und Resuspension noch eine mittlere Ausbeute von 2.3×10^6 Zellen, d.h. unsere ursprüngliche Zellernte war mit 3.9×10^6 noch über der Ausbeute von 3.2×10^6 bei TS'AO und RUDER.

Weiterhin empfiehlt es sich, die Zellsuspension nicht länger als 7 min. bei 200 g zu zentrifugieren. BENDIXEN und SØBORG (1970) stellten schon bei einer Zentrifugation länger als 5 min. eine Verklumpung der Zellen fest.

Auch die von uns nach MYGIND und STENBJERG (1974) angewandte Resuspension im 10-minütigen Abstand während der Präinkubationszeit sollte aus denselben Gründen nicht mit einem elektrischen Rüttler, sondern durch vorsichtiges Schwenken durchgeführt werden.

Einfluß der Heparinisierung

CLAUSEN (1971) fand bei einer Lagerungszeit des heparinisierten Vollblutes von mehr als 3 Stunden einen negativen Effekt auf die LIF-Bildung, den er auf Zellalterung zurückführte. PICK und MANHEIMER (1974) und MÄKINEN et al. (1977) beschrieben einen negativen Einfluß von Heparin auf die LIF-Wirkung bei einer Lagerung des Blutes länger als 90 Minuten. Wir konnten keinen negativen Effekt von Heparin feststellen, da wir die Leukozyten sofort verarbeiteten. Ist dies nicht möglich, so sollte das Blut nach MÄKINEN (1977) defibriniert werden.

Agarosezugabe

Wir verwendeten eine Agarosekonzentration von 1.2 % für alle Versuche, da wir mit einer Konzentration von 1.0 % (CLAUSEN 1973d) eine für die exakte Auswertung noch zu starke Disseminierung der Leukozyten im Randbereich der Migrationshöfe feststellten.

Eine Abnahme der Migration bei einer Konzentration unter 1 % (REPO 1977) konnten wir nicht bestätigen. Dieser Unterschied zu den Untersuchungen von REPO könnte auf die Verwendung von Agarose verschiedener Herkunft zurückzuführen sein. Bei Versuchen mit Agarose der Firma SERVA (Heidelberg) erzielten wir schlechtere Ergebnisse als bei Verwendung von Indubiose A 37 der Industrie Biologique Française (Paris).

Individuelle Schwankungsbreite der Migration

Bei Messungen der Migrationsweite an verschiedenen Personen innerhalb eines halben Jahres ergab sich eine hinreichende Konstanz der individuellen Migration.

Auswertung der Migrationshöfe

Durch die Verwendung von Papier einer Charge, auf das die Migrationshöfe in Vergrößerung mit Hilfe eines Mikroskop-Zeichengerätes und eines fixierten Zeichentisches übertragen wurden, konnten wir gleichbleibend zuverlässige Migrationswerte gewährleisten.

Diese einfache Auswertungsmethode kann ohne größeren Zeit- und Kostenaufwand in Routinelaboratorien übernommen werden.

Standardisierung der CLAUSEN-Technik

Zellzahl

Im Gegensatz zu AX und TAUTZ (1974) und LOHRMANN (1978) konnten wir mit 1.25×10^6 Granulozyten pro Ansatz bei unseren Versuchen keine optimale Hofgröße erzielen.

Die von CLAUSEN (1973d) festgestellte Verschlechterung der Migration ab 3.0×10^6 Granulozyten pro Ansatz konnten wir nicht bestätigen, da in unseren Versuchen selbst eine Zellzahl von 5.0×10^6 keine Abnahme der Migration oder Migrations-Inhibition bewirkte.

Wir erzielten mit 2.5×10^6 Granulozyten pro Ansatz die besten Ergebnisse und führten alle weiteren Versuche mit dieser Zellzahl durch.

PPD-Konzentration

Eine Steigerung der PPD-Konzentration über 200 µg PPD/ml hatte zwar keinen toxischen Effekt auf die Leukozyten, führte jedoch auch zu keiner wesentlichen Zunahme der Migrations-Inhibition, so daß wir uns auf die Konzentration von 150 µg PPD/ml festlegten. Auch unter diesen Bedingungen führte erst eine Granulozytenzahl von 2.5×10^6 zu einer eindeutig nachweisbaren LIF-Produktion.

CLAUSEN (1973c), ASTOR et al. (1973), MYGIND und STENBJERG (1974) und BERGSTRAND et al. (1974) geben 75 µg PPD/ml als optimale Antigenkonzentration an.

Autologes und heterologes Serum im Agar

Die Verwendung von heterologem statt autologem Serum im Agar der Testansätze würde eine methodische Vereinfachung und Elimination eines zusätzlichen Einflusses von individuellen Störfaktoren auf die Migration bedeuten. Wir konnten zwar feststellen, daß der Zusatz von Pferdeserum zu einer gewissen Verkleinerung der Migrationshöfe führte, nahmen jedoch im Hinblick auf eine bessere Standardisierung des Testsystems diesen Nachteil in Kauf. Dieser migrationshemmende Effekt von Pferdeserum könnte auf präformierten LIF im Serum zurückzuführen sein. In fötalem Kälberserum z.B. konnten CLAUSEN (1971), FOX et al. (1974), ANDERS und NATVIG (1976) LIF-Aktivität nachweisen.

Entsprechende, allerdings präliminäre Untersuchungen zeigten, daß SIF-positive Seren von Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis eventuell auch LIF enthalten, da besonders stark SIF-positive Seren die PPD-induzierte Migrations-Inhibition verstärkten.

Inkubation

Ferner waren wir daran interessiert, den frühesten Zeitpunkt zu erfassen, der zur Messung der LIF-Aktivität herangezogen werden kann. Bei der Testung der Kontrollen ließ sich zeigen, daß 87 % der gesamten Migration in den ersten 6 Stunden der Inkubation erreicht wurden. Ähnliche Beobachtungen machte auch CLAUSEN (1973 a, b), der eine ausgeprägte Migration in den ersten 4 Stunden der Inkubation fand. Dagegen waren nach 18 Stunden die Randbezirke der Migrationshöfe stärker disseminiert und dadurch schlechter meßbar. WILLOUGHBY et al. (1978) beobachtete ebenfalls 70-80 % der gesamten Migration nach 6-8 Stunden.

Auch in Gegenwart des Antigens konnte nach 6 Stunden Inkubation eine maximale Migrations-Inhibition erreicht werden. Dieser Befund stimmt ebenfalls mit Beobachtungen aus der Literatur überein (ERARD [1974] fand nach 6 Stunden, WILLOUGHBY [1978] nach 4 Stunden eine maximale Inhibition). PICK (1974) wies beim Meerschweinchen MIF-Aktivität schon 6 Stunden nach Beginn des Antigen-Kontaktes nach, was dafür spricht, daß schon nach dieser Zeit eine optimale Migrations-Inhibition auftreten müßte. BENNETT und BLOOM (1967) beobachteten dasselbe Phänomen auch beim Menschen.

Präinkubation

Da der Kontakt des Antigens mit den Leukozyten eine wesentliche Rolle für das Ausmaß der LIF-Produktion spielt, untersuchten wir den Einfluß der Präinkubation auf die Migrations-Inhibition.

Die Leukozyten wurden 1/2 bis 6 Stunden vor der Beimpfung der Agaroseschalen mit Antigen präinkubiert und anschliessend inkubiert. Optimale Migrationswerte wurden erreicht, wenn die Leukozyten 6 Stunden mit Antigen präinkubiert und dann 6 Stunden zur Migration inkubiert wurden.

Es stellte sich heraus, daß unter letzteren Bedingungen bei 2.5×10^6 Granulozyten und 150 µg PPD/ml alle Tuberkulin-positiven Personen eine deutliche Migrations-Inhibition zeigten. Diese Bedingungen können also als optimal bezeichnet werden. Allerdings muß einschränkend festgestellt werden, daß die Durchführung des Testes einen 12-stündigen Einsatz des Personals verlangt, was bei wissenschaftlicher Anwendung im allgemeinen möglich, für die Routinediagnostik aus naheliegenden Gründen problematisch sein dürfte.

Spezifität der Migrations-Inhibition

Es konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der PPD-induzierten Migrations-Inhibition und den Ergebnissen in der spezifischen Lymphozyten-Stimulation mit PPD aufgezeigt werden. Im Gegensatz zur Stimulation mit Tetanol zeigten Tuberkulin-positive Personen bei Stimulation mit PPD stärkere Unterschiede gegenüber einer Tuberkulin-negativen Kontrollperson.

Der TINE-Hauttest und die Reaktion im LMIT stimmten überein, wir konnten so die Ergebnisse von ANDERS und NATVIG (1976) im Agarosetest und von SENYK und HADLEY (1973) im Kapillartest bestätigen. Die Spezifität unseres Testsystems war somit erwiesen.

Einfluß von Seren mit immunsuppressiven Faktoren (SIF) auf die PPD-induzierte Migrations-Inhibition

Es konnte früher gezeigt werden, daß Seren von Patienten mit Virus-assoziierten Erkrankungen Hemmfaktoren (SIF) enthalten, die die Mitogen-induzierte Stimulierbarkeit normaler Lymphozyten inhibieren.

Dieses Phänomen konnte v.a. mit Seren von Patienten mit akuter und chronischer HBsAG-positiver Hepatitis nachgewiesen werden. MELLA und LANG wiesen 1967 erstmals nach, daß Seren von Patienten mit akuter Virushepatitis die Mitogen-induzierte Lymphozyten-Proliferation hemmten. Durch weitere Untersuchungen wurde dieser Befund bestätigt (WILLEMS et al. 1969, NEWBLE et al. 1975). 1973 kamen Ergebnisse von NEWBERRY et al. hinzu, die zeigten, daß auch Seren von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen die mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation unterdrückten; diese Ergebnisse wurden von NAKAO et al (1975), der bei Patienten mit AVH, CAH und Leberzirrhose immunsuppressorische Aktivitäten (SIF) im Serum fand, TREMOLADA et al (1977) mit SIF-Befunden im

Serum von AVH- und CAH-Patienten, BRATTIG und BERG (1976) und BRATTIG (1978) bestätigt. NAKAO et al. (1978) wies auf die prognostische Relevanz von SIF bei Lebererkrankungen hin.

Damit stellte sich uns die Frage, inwieweit auch andere Mediatoren der Immunantwort gleichzeitig in diesen Seren vorkommen.

Wir testeten deshalb 12 Seren von Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis, die eindeutig SIF-Aktivität besaßen, auf ihren Einfluß im Leukozyten-Migrations-Test. In unseren Versuchen konnte bei den Seren der SIF-Aktivitäts-Gruppe II eine eindeutige Aufhebung der Migrations-Inhibition in Anwesenheit von PPD nachgewiesen werden. Dies könnte im Sinne einer Suppression der LIF-Bildung interpretiert werden.

Bei der Untersuchung der Wirkung der SIF-positiven Seren auf die Migration ohne PPD fanden wir eine Hemmung der Migration bei 70 % der Fälle, wobei auffiel, daß die Seren des SIF-Aktivitäts-Grades III stark hemmten, während die Inhibition bei Seren der Gruppe II und I geringer war. Auf eine Berechnung der Änderung des Migrations-Index durch SIF-Seren wurde verzichtet, da durch die Bildung des Index die getrennten Einflüsse auf Leerwert und PPD-Wert nicht deutlich werden und zu falschen Schlüssen bezüglich der LIF-Bildung und des LIF-Gehaltes der SIF-Seren führen könnten.

Als Erklärung für dieses Phänomen bietet sich an, daß LIF in den getesteten Seren präformiert vorhanden war und die Inhibition verursachte bzw. teilweise verstärkte. Dazu passen die Beobachtungen von BRULEY-ROSSET et al. (1977) und YOSHIDA et al. (1975), die eine Leukozyten-Migrations-Inhibition bei Seren von Patienten mit Infektionskrankheiten nachwiesen. Auch wurde Antigen-induzierte Migrations-Inhibition bei akuten und chronischen Lebererkrankungen nachgewiesen: DE MOURA et al. (1975) fanden während der akuten

Phase einer Virushepatitis bei Zugabe des gereinigten HBsAG zum LMIT eine Inhibition der Leukozyten-Migration, die sich während der Rekonvaleszenz nicht mehr nachweisen ließ. Allerdings konnte bei nur 1 von 15 CAH-Patienten diese Inhibition durch HBsAG nachgewiesen werden.

Unklarheit besteht auch über die Wirkung von Immunkomplexen auf die Migration der Granulozyten in unserem System. Diese hauptsächlich aus IgG und C'3 bestehenden Immunkomplexe wurden bei HÜTTENROTH et al. (1978) bei AVH zu 20 % und bei CAH zu 58 % gefunden. BLANK (1977) beobachtete einen migrationshemmenden Einfluß bei Immunkomplexen in präzipitierter Form und eine starke Stimulation der Migration durch Immunkomplexe in gelöster Form.

Diese allerdings sehr präliminären Beobachtungen weisen darauf hin, wie wichtig es heute ist, auch diese immunregulativen Faktoren bei der Interpretation der LIF-Werte in Betracht zu ziehen. Darüber hinaus könnte sich in diesem Testsystem ein interessanter Ansatzpunkt ergeben, die Wirkungsmechanismen solcher Faktoren näher zu untersuchen.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei unseren Untersuchungen zu einer Standardisierung des direkten LMIT nach CLAUSEN kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

Durch Verwendung einer einfachen Mikroskop-Zeicheneinrichtung und eines fixierbaren Zeichentisches zum vergrößerten Abzeichnen der Migrationshöfe und anschließendes Ausschneiden und Abwiegen der Papierstücke erreichten wir auf schnelle und ökonomische Weise sehr genaue Werte für die Migrationshofgröße.

Mit einer Zellzahl von 2.5×10^6 Granulozyten pro Ansatz konnten wir optimale Migrationshöfe herstellen.

150 µg PPD/ml erwiesen sich als beste Antigen-Konzentration.

Die Zugabe von Pferdeserum zum Nähragar verminderte im Vergleich zum autologen Serum nur gering die Migration, erlaubte aber eine weitere Standardisierung der Versuchsbedingungen.

Nach einer Inkubation von 6 Stunden war ein hoher Prozentsatz der Zellen bereits migriert; innerhalb dieser Zeit ließ sich auch eine maximale Migrations-Inhibition erreichen, so daß auf die bisher beschriebene Inkubationszeit von 18 Stunden verzichtet werden konnte.

Ferner konnte durch eine Verlängerung der Präinkubation auf 6 Stunden und damit des Lymphozyten-Antigen-Kontaktes vor Beginn der Migration eine verstärkte LIF-Produktion induziert werden.

In Verlaufskontrollen mit Lymphozyten von Tuberkulin-positiven Spendern konnte gezeigt werden, daß bei Kombination von 6 Stunden Prä- und 6 Stunden Inkubation die zuverlässigste und stärkste Migrations-Inhibition erzielt werden konnte.

Bei der Testung von SIF-haltigen Seren in unserem System konnten wir eine Aufhebung der Migrations-Inhibition im Sinne einer immunsuppressorischen Aktivität nur bei Seren des SIF-Aktivitätsgrades II nachweisen. Die übrigen Seren hemmten die Migration der Zellen ohne Antigen mehr oder weniger stark. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis auf in den Seren vorhandenen präformierten LIF sein.

LITERATURVERZEICHNIS

Anders E.M., Natvig J.B.: Cell-mediated immunity to viruses measured by the indirect agarose-technique of leucocyte migration inhibition.
Cell.Immunol. 27: 214-229 (1976).

Astor S.H., Spitler L.E., Frick O.L., Fudenberg H.H.: Human leucocyte migration inhibition in agarose using 4 antigens: Correlation with skin reactivity.
J.Immunol. 110: 1174-1179 (1973).

Ax W., Tautz Chr.: Assay of leucocyte migration inhibition under agarose.
Behring-Inst.Mitteilg. 54: 72-80 (1974).

Bendixen G., Søborg M.: Comments on the leucocyte migration technique as an in vitro method for demonstrating cellular hypersensitivity in man.
J.Immunol. 104: 1551-1552 (1970).

Bennett B., Bloom B.R.: Studies on the migration inhibitory factor associated with delayed-type hypersensitivity. Cytodynamics and specifity.
Transplantation 5: 996-1000 (1967).

Bergstrand H., Kaellén B., Nilsson O.: On the reactivity of human leucocytes to PPD in clausen's agarose migration technique.
Acta Allergol. (KBH) 29/2: 117-135 (1974).

Blank I.: Untersuchungen über den Einfluß von Immunkomplexen auf die in-vitro-Migration von Blutgranulozyten des Menschen.
Allergie Immunol. 23: 313-321 (1977).

Bloom B.R., Bennett B.: Mechanism of reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity.
Science 153: 80-82 (1966).

Brattig, N., Berg P.A.: Serum inhibitory factors (SIF) in patients with akute and chronic hepatitis and their clinical significance.
Clin.Exp.Immunol. 25/1: 40-49 (1976).

Brattig, N.: Untersuchungen zur Bedeutung Immunsuppressiver Serum-Faktoren bei der akuten und chronischen Hepatitis.
Diss. zur Erlangung d. Grades eines Doktors d. Nat. Wiss., Tübingen (1978).

Brostoff J.: 'Escape' from leucocyte migration inhibition.
J.Immunol.Methods 3/1: 27-30 (1974).

Bruley-Rosset M., Botto H.G., Goutner A.: Serum migration inhibitory activity in patients with infectious diseases and various neoplasia.
Eur.J.Cancer 13: 325-327 (1977).

Bullen A.W., Losowsky M.S.: Comparison of a leucocyte adherence test with the leucocyte migration inhibition test and skin reactivity to PPD.
Clin.Exp.Immunol. 31: 408-413 (1978).

Clausen J.E.: Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in agarose medium.
Acta Allergol. 26: 56-80 (1971).

Clausen J.E.: Migration inhibitory effect of cell-free supernatants from mixed human lymphocyte cultures.
J.Immunol. 108: 453-459 (1972).

Clausen J.E.: Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral blood leucocytes after 2, 4 and 20 hours in agarose culture.
Acta Allergol. 28: 28-41 (1973) a).

Clausen J.E.: Comparison between capillary tube and agarose migration technique in the study of human peripheral blood leucocytes.
Acta Allergol. (KBH) 28/2: 145-158 (1973) b).

Clausen J.E.: Dose-effect relationship between tuberculin-concentration an tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral blood leucocytes demonstrated by agarose migration technique.
Acta Allergol. 28: 159-171 (1973 c).

Clausen J.E.: Leucocyte migration agarose technique: some technical details.
Acta Allergol.(KBH) 28/5: 351-364 (1973) d).

Clausen J.E.: Migration inhibitory effect of cell-free supernatants from tuberculin-stimulated cultures of human mononuclear leucocytes demonstrated by two-step MIF agarose assay.
J.Immunol. 110/2: 546-551 (1973) e).

David J.R., Al-Askari S., Lawrence H.S., Thomas L.: Delayed hypersensitivity in vitro. I. The specificity of inhibition of cell-migration by antigens.
J.Immunol. 93: 264-279 (1964).

David J.R.: Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 56: 1125-1134 (1966).

Douwes F.R., Lippmann-Nielsen J., Hanke R.: Gliadin-induzierte Migrationshemmung peripherer Leukozyten in der Agaroseplattentechnik bei Patienten mit Coeliakie.
Dt.Med.Wo.Schri. 102: 721-724 (1977).

Erard P.: Technical study of the leucocyte migration inhibition test in agarose.
Clin.Exp.Immunol. 18: 439-448 (1974).

Fox R.A., Gregory D.S., Feldman J.D.: Migration inhibition factor (MIF) and migration stimulation factor (MSF) in fetal calf serum.
J.Immunol. 112: 1861-1866 (1974).

George M., Vaughan J.H.: In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity.
Proc.Soc.Exp.Biol. N.Y. III: 514-521 (1962).

Goldberg L.S., Louie J.S., Baker M.H.: Inhibition of macrophage migration: a test system using human monocytes.
J.Immunol. 107/3: 906-909 (1971).

Hüttenroth T.H., Arnold W., Hopf U., Meyer zum Büschenfelde K.H.: Zirkulierende Immunkomplexe bei akuter Virushepatitis (AVH), chronisch-aktiver Hepatitis (CAH) und Periarteriitis modosa.
Z.f.Gastroenterol. Nr. 6,16: 395-402 (1978).

Kaltreider H.B., Soghor D., Taylor J.B., Decker J.L.: Capillary tube migration for detection of human delayed hypersensitivity: difficulties encountered with 'buffy-coat' cells and tuberculin antigen.
J.Immunol. 103/2: 179-184 (1969).

Katz S.J., De Petz B.H., Zaias N.: Production of macrophage inhibitory factor by patients with leprosy.
Arch.Dermatol. 103: 358-361 (1971).

Lohrmann A.: Immunregulatorische Aktivitäten in Seren und Synovialflüssigkeiten von Patienten mit Primär-chronischer Polyarthritis.
Inauguraldissertation, Tübingen (1978).

Mäkinen T., Toetterman T.H., Gordin A., Weber T.H.: Migration inhibition factor and the blood clotting system: effects of defibrination, heparin and thrombin.
Clin.Exp.Immunol. 29/1: 181-186 (1977).

Maini R.N., Roffe L.M., Magrath I.T., Dumonde D.C.: Standardization of the leucocyte migration test.
Int.Arch.Allergy Appl.Immunol. 45/1: 308-321 (1973).

Mella B., Lang D.J.: Leucocyte mitosis: suppression in vitro associated with acute infectious hepatitis.
Science 155: 80-81 (1967).

De Moura M.C., Vernace S.J., Paronetto F.: Cell-mediated immune reactivity to hepatitis B surface antigen in liver diseases.
Gastroenterol. 69/2: 310-317 (1975).

Mygind K., Stenbjerg S.: Leucocyte migration test in agarose.
Acta Path. Microbiol. Scand., Sect.B 82: 277-282 (1974).

Nakao M., Mizoguchi Y., Monna T., Yamamoto S., Morisawa S.: Studies on the subpopulation and function of peripheral lymphocytes and inhibitor to PHA stimulation existing in the serum of patients with liver diseases. Gastroenterol.Jap. 10: 307-315 (1975).

Nakao M., Mizoguchi Y., Monna T., Yamamoto S., Morisawa S.: Studies on an inhibitory factor to phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation found in the serum of patients with various liver diseases. Acta Hepatogastroenterol.(Stuttg) 25/5: 335-343 (1978).

Newberry W.M., Shorey J.M., Sanford J.P., Combes B.: Depression of lymphcyte reactivity to phytohemagglutinin by serum from patients with liver diseases. Cell.Immunol. 6: 87-97 (1973).

Newble D.T., Holmes K.T., Wangel A.G., Forbes I.J.: Immune reactions in acute viral hepatitis. Clin.Exp.Immunol. 20: 17-28 (1975).

Pick E., Manheimer S.: The mechanism of action of soluble lymphocyte mediators. II. Modification of macrophage migration and migration inhibitory factor action by drugs, enzymes and cationic environment. Cell.Immunol. 11/1-3: 30-46 (1974).

Pick E.: Soluble lymphocyte mediators. I. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor production by drugs. Immunol. 26/3: 649-658 (1974).

Remold H.G., Mednis A.D.: Two migration inhibitory factors with different chromatographic behaviour and isoelectric points. J.Immunol. 118(5): 2015-2019 (1977)

Remold H.G., Mednis A.D.: Two migration inhibitory factors differ in density and susceptibility to neuraminidase and proteinases. J.Immunol. 122(5): 1920-1925 (1979)

Repo H.: Leucocyte migration agarose test for the assessment of human neutrophil chemotaxis. I. Effects of environmental factors on neutrophil migration under agarose.
Scand.J.Immunol. 6: 203-209 (1977).

Rich A.R., Lewis M.R.: Mechanism of allergy in tuberculosis.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 25: 596-598 (1928).

Rocklin R.E.: Products of activated lymphocytes: Leucocyte inhibitory factor (LIF) distinct from migration inhibitor factor (MIF).
J.Immunol. 112/4: 1461-1466 (1974).

Rocklin R.E.: Partial characterization of LIF by Con-A stimulated human lymphocytes,
J.Immunol. 114/4: 1161-1165 (1975).

Rocklin R.E., Rosenthal A.S.: Evidence that human leucocyte inhibitory factor (LIF) is an esterase.
J.Immunol. 119/1: 249-252 (1977).

Rosenberg S.A., David J.R.: Inhibition of leucocyte migration: an evaluation of this in vitro assay of delayed hypersensitivity in man to a soluble antigen.
J.Immunol. 105/6: 1447-1452 (1970).

Senyk G., Hadley W.K.: In vitro correlates of delayed hypersensitivity in man: ambiguity of polymorphonuclear neutrophils as indicator cells in leucocyte migration test.
Infect. and Immunity 8: 370-380 (1973).

Søborg M., Bendixen G.: Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity.
Acta Med.Scand. 181: 247-256 (1967).

Spitler L., Huber H., Fudenberg H.H.: Inhibition of capillary migration by antigen-antibody complexes.
J.Immunol. 102: 404-411 (1969).

Spitler L.E.: Letter: The use of the cell migration inhibition test.
J.Immunol. 112/1: 436 (1974).

Tremolada, F., Fattowich, G., Angi M., Rude L., Realdi R.: Lymphocyte function and serum factors in HBsAG-positive acute (AH) and chronic active hepatitis (CAH) and in chronic healthy carriers (CHC).
12th Meeting of the European Association (1977) for the Study of the Liver (EASL), Karger Basel Nr. 261 (Abstr.).

Ts'ao C., Ruder, E.A.; Ultrastructural damage of leucocytes produced by the leucopak: vulnerability of leucocytes to mechanical injury.
Transfusion 16/4: 336-344 (1976).

Warrington R.J., Buehler S.K., Roberts K.B.: A comparison of the direct and indirect leucoycte migration test in man.
J. Immunol. Methods 10: 133-141 (1976).

Whitcomb M.E., Rocklin R.E.: Transfer factor therapy in a patient with progressive primary tuberculosis.
Ann. Intern. Med. 79: 161-166 (1973).

Willems F.T.C., Melnick J.L., Rawls W.E.: Viral inhibition of the PHA response of human lymphocytes and application to the viral hepatitis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130: 652-661 (1969)

Willoughby E.W., Dupont B., Hansen J.A., Good R.A.: The indirect assay for leucocyte migration inhibitory factor (LIF)--standardization and the effect of pH.
J. Immunol. Methods 22/1-2: 99-110 (1978).

Yoshida T., Edelson R., Cohen S., Green I.: Migration inhibitory activity in serum and cell-supernatants in patients with Sezary Syndrome.
J. Immunol. 114: 915-918 (1975).

LEBENSLAUF

Am 5. Juli 1955 wurde ich, Barbara Fink-Lebsanft, als Tochter des Bezirksschornsteinfegermeisters Manfred Fink und seiner Ehefrau, der Buchhändlerin Hilde Fink, geb. Marstaller in Esslingen am Neckar geboren.

Nach vierjähriger Grundschulzeit in Weilheim/Teck besuchte ich zunächst das Schloß-Gymnasium und danach bis zum Abitur 1974 das Ludwig-Uhland-Gymnasium in Kirchheim/Teck.

Im Wintersemester 1974/75 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen auf.

Die medizinische Vorprüfung absolvierte ich im August 1976, den ersten Teil der ärztlichen Prüfung im März 1978 in Tübingen.

1979-1980 verbrachte ich ein Studienjahr an der Universität René Descartes in Paris, wo ich Praktika in Psychiatrie und Neurologie im Centre Hospitalier Ste. Anne machte.

Im März 1981 legte ich in Tübingen den zweiten Teil der ärztlichen Prüfung ab. Es folgte das Internatsjahr im Universitätsklinikum Tübingen mit Wahlfach Gynäkologie.

Am 21. April 1982 bestand ich in Tübingen den dritten Teil der ärztlichen Prüfung, am 30. April 1982 erhielt ich die Approbation als Ärztin.

Mein Studium und Auslandsaufenthalt wurden von der Studienstiftung des deutschen Volkes gefördert.